



(19) RU (11) 2 084 458 (13) C1
(51) Int. Cl. 6 C 07 K 7/06, A 61 K 38/08

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 93026760/04, 27.05.1993

(46) Date of publication: 20.07.1997.

(71) Applicant:
Institut vysokomolekuljarnykh soedinenij RAN

(72) Inventor: Vlasov G.P.,
Burov S.V., Semko T.V.

(73) Proprietor:
Institut vysokomolekuljarnykh soedinenij RAN

(54) DECAPEPTIDE SHOWING ANTITUMOR ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: peptides. SUBSTANCE: product: decapeptide of the formula: H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ is synthesized by solid-phase method using peptide synthesizer NPS-400 on 4-methylbenzhydrylaminopolymer. The following derivatives of L-amino acids were used: N-tert.-butylhydroxycarbonylglycine, N-tert.-butylhydroxycarbonyl-N-(mesithylene-2-sulfo

-)argini- -ne,
N-tert.-butylhydroxycarbonyl-O-(3-bromobenzyl)-tyrosine and derivatives of D-amino acids: N α-tert.-butylhydroxycarbonyl-N-2-chlorobenzylhydroxycarbonyl-D-lysine and N-tert.-butylhydroxycarbonyl-D-phenylalanine. Trifluoromethanesulfonic acid is used for peptide refining from the resin. Synthesized peptides were used in medicine and biochemistry. EFFECT: enhanced effectiveness of decapeptide. 3 tbl

R U
2 0 8 4 4 5 8
C 1

RUSSIAN FEDERATION

(19)

(11)

(13)

RU

2 084 458

C1

(51) IPC



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) SPECIFICATION OF INVENTION FOR A PATENT

Many luliberin agonists and antagonists have been synthesized (See Table 1). Both products are applicable in oncology for their being able to lower hormone level in blood, thus influencing hormone-dependent tumour growth.

Agonists are substances that bind to luberin receptors to cause luliberinous effect. Long-lasting administration of high doses of highly active agonists results in paradoxical inhibition effect associated with reduced quantity of corresponding receptors.

Antagonists also tend to bind to luberin receptors, but nevertheless they tend to cause no luliberinous effect. Antagonists are competitive inhibitors of luliberin.

R U 2 0 8 4 4 5 8 C 1

R U 2 0 8 4 4 5 8 C 1



(19) RU (11) 2 084 458 (13) C1
(51) МПК⁶ С 07 К 7/06, А 61 К 38/08

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

R U
2 0 8 4 4 5 8 C 1

(21), (22) Заявка: 93026760/04, 27.05.1993

(46) Дата публикации: 20.07.1997

(56) Ссылки: 1. LH -RH and its Analogues. Basic and Clinical Aspects, ed F. Labrie, A. Belanger, A. Dupont, Excepte Medica, Amsterdam - New York - Oxford (1984). 2. J. Waxman с сопр. Br. Med. J., v. 291, p. 1387, 1985. 3. D. P. Rose, B. Pruitt, Cancer Res., v. 39, p. 3968, 1979. 4. Furr B.J.A., Hutchinson F. G. in Progress in Clinical and Biological Research, v. 185 A, New - York, 1985. 5. T.W. Redding, D.H. Coy, H.V. Shally, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 1273 (1982). 6 Collected Tentative Rules & Recommendations of the Commission on Biomedical Nomenclature JUPAC - JUB, second ed. (1975) American Soc. of Biol. Chemists, Inc. Bethesda, Maryland, USA. 7. C.Bowers, X. Shao - bo, p.-F.L. Tang, M. Kubota, B.B.R.C. v. 137, N 1, p. 709 (1986). 8. Karten, J. E. Rivier, Endocrine Rev., v. 7, N 1, p. 44 (1986). 9. V.K. Sarin, S.B.H. Kent, M. Engelhard, R.B., Merrifield, Anal. Biochem., v. 117, N 1, p. 147 (1981). 10. E. Kaiser, C. D. Bossinger, R. L. Collescott, O.B. Olsen, Analytical chimica Acta, v. 118, p. 149 (1980). 11. Synthetic Polypeptides as Antigens, ed. R.H. Burdon, P.H. van Knirrenberg, Laboratory Techniques in Biochem. and Molecular Biology v. 19, Amsterdum etc, Elsvier (1988).

(71) Заявитель:
Институт высокомолекулярных соединений
РАН

(72) Изобретатель: Власов Г.П.,
Буров С.В., Семко Т.В.

(73) Патентообладатель:
Институт высокомолекулярных соединений
РАН

(54) ДЕКАПЕТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Использование: в биохимии и медицине.
Сущность изобретения: декапептид формулы:
H-Pro-DPhe-Pro-Ser-Tyr -
DLys-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂ синтезирован
твердофазным методом с использованием
пептидного синтезатора NPS-400 на
4-метилбензигриламинополимере,
производных аминокислот L-ряда;
N-трет-бутилоксикарбонил глицин, N-трет -

бутилоксикарбонил-N^G-
/мезитилен-2-сульфо/аргинин,
N-трет-бутилоксикарбонил
-O-3-бромбензил/тирозин и производных
аминокислот D-ряда; N^a - трет-бутилокси-
карбонил-
N^c -2-хлорбензилоксикарбонил/D-лизин и
N-трет-бутилоксикарбонил-D-фенилаланин,
для очищения пептида от смолы
использована трифторметансульфокислота. 3
табл.

R U ? 0 8 4 4 5 8 C 1

Изобретение относится к химии пептидов, точнее к декапептиду, аналогу рилизинг-фактора лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов люлиберина, обладающего противоопухолевой активностью на экспериментальных моделях гормон-зависимых опухолей.

Декапептид имеет следующую общую структуру:

$$\text{H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$$

Изобретение может стать основой для создания лекарственной противоопухолевой формы.

Известно, что при терапии ряда онкологических заболеваний (опухоли яичников, простаты, молочной железы, ряда хондросарком и остеосарком) в качестве лекарственных средств используют аналоги пептидных гормонов, в частности, люлиберина (1).

Люлиберин амид линейного декапептида:

$$\text{pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$$

Основной его функцией в организме является регуляция выделения лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, которые, в свою очередь, влияют на уровень половых стероидных гормонов.

Синтезировано множество агонистов антагонистов люлиберина (см. табл. 1). Как те, так и другие могут применяться в онкологии, поскольку они способны снижать уровень гормонов и влиять таким образом на рост гормон-зависимых опухолей.

Агонисты вещества, которые связываются с люлибериновыми рецепторами и вызывают люлиберино-подобный эффект. При длительном введении больших доз высокоактивных агонистов развивается эффект парадоксальной ингибиции, связанный с уменьшением количества соответствующих рецепторов.

Антагонисты также связываются с люлибериновыми рецепторами, но люлиберино-подобного эффекта не вызывают и являются конкурентными ингибиторами люлиберина.

Такие агонисты как: "Декапептил"-pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Ac-Pro-Gly-NH₂ (2,6); "Бусериллин"-pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt (3, 6); "Лейпролид"-pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt (3); "Золадекс"-pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-Aza-Gly (4) производятся в промышленности и используются в клинике.

В качестве возможных противоопухолевых препаратов описаны и антагонисты люлиберина (9):

Ac-p-F-D-Phe-p-Cl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂,
Ac-p-Cl-D-Phe-p-Cl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

(При написании структур использованы сокращения аминокислот, рекомендованные IUPAC-IUB (6), а также: NHEt этиламид, Aza-Gly-аза-глицин, D-Ser(Bu^t)-O-(трет-бутил)-D-серин, Ac ацетил, p-F-D-Phe пара-фтор-D-фенилаланин,

p-Cl-D-Phe-пара-хлор-D-фенилаланин).

Большинство высокоактивных антагонистов люлиберина получают путем многостепенных замен в последовательности гормона на неприродные аминокислоты и аминокислоты D-конфигурации, что значительно повышает стоимость синтеза. Кроме того, наличие протяженных участков, состоящих из гидрофобных аминокислотных остатков, характерных для такого рода препаратов, приводит к развитию аллергических реакций (N⁷). Определенным недостатком известных аналогов люлиберина является также наличие остатков триптофана и гистидина, подверженных побочным реакциям.

В зависимости от структуры стоимость агонистов или антагонистов люлиберина составляет от 100 до 500 DM за 5 мг (см. каталог "Bachem", 1991 г.).

Задачей предлагаемого изобретения является полипептид обладающий высокой биологической активностью и лишенный вышеупомянутых недостатков, то есть не содержащий триптофана, гистидина и не имеющий протяженных участков, состоящих из гидрофобных неприродных аминокислот.

Эта задача решалась декапептидом общей формулы:

$\text{H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Prg-Pro-Gly-NH}_2$

Заявленный декапептид синтезировали твердофазным методом с использованием стандартных приемов.

Анализ известного уровня науки и техники показал, что заявленный декапептид является новым и отличается по структуре от наиболее близких аналогов:

H-Pro-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (заявленный декапептид);
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂(люлиберин);

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂,

aGlu-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (два последних пептида из каталога фирмы "Bachem", 1991)

Таким образом, можно утверждать, что вещество соответствует требованию "новизна".

Заявленный декапептид в отличие от большинства известных аналогов люлиберина, имеющих на N-конце пироглутамовую кислоту или защищенный аминокислотный остаток, содержит в первом положении свободный пролин. Получение высокоактивного вещества при подобной модификации невозможно было предсказать заранее, поскольку существует мнение, что свободный N-конец в такого рода препаратах приводит к снижению биологической активности (8), что доказывает неочевидность предлагаемого решения.

Нами было показано, что рассматриваемый декапептид обладает высокой противоопухолевой активностью при терапии рака простаты у крыс до 84% торможения роста опухоли в дозе 100 мкг/кг в день, что соответствует 25 мкг на животное. В том же тесте и той же дозе коммерческий препарат "бусериллин" показал торможение роста опухоли 63%. Было найдено также, что заявленный декапептид оказывает тормозящее воздействие (до 54%) на рак

RU 2084458 C1 ? 084458 RU

эквивалента (3,3 ммоль) защищенного производного аминокислоты и 0,446 г 1,гидроксибензотриазола (3,3 ммоль), при охлаждении до 0°C и перемешивании добавляли 0,517 мл N,N'-дизопропилкарбодиимида (3,3 ммоль), через 30 мин вносили в реактор. По окончании конденсации дважды промывали пептидил-полимер 20 мл диметилформамида по 1 мин, промывали 20 мл хлористого метилена 1 мин, выполняли тест на полноту прохождения реакции пептидообразования. В случае необходимости остаточные аминогруппы блокировали уксусным ангидридом, как было описано выше.

После присоединения последнего аминокислотного остатка удаляли N-концевую трет-бутилоксикарбонильную группировку в соответствии с протоколом деблокирования, после чего пептидил-полимер высушивали и отщепляли пептид от смолы по следующей методике: к 1 г пептидил-полимера добавляли 1,5 мл тиосанизола, перемешивали на магнитной мешалке 10 мин, затем при охлаждении 0°C приливали 10 мл трифторметансульфокислоты, перемешивали 10 мин. По каплям добавляли 1 мл трифторметансульфокислоты; снимали охлаждение и перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Разбавляли реакционную смесь 250 мл охлажденного серного эфира и отфильтровывали осажденный на полимере пептид на фильтре Шотта. Затем смывали пептид с полимера 3 мл трифторметансульфокислоты и высаживали 250 мл серного эфира. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Затем пептид обессоливали на колонке с сефадексом G-15 (1,9 x 110 см в 50% уксусной кислоте).

Предварительную очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом SE C-25 в градиенте пиридин-ациетатного буфера. Получили 0,148 г пептида с чистотой 75% по данным высокоэффективной обращеннофазовой жидкостной хроматографии.

Окончательную очистку производили с помощью высокоэффективной обращеннофазовой жидкостной хроматографии на хроматографе фирмы "Millipore - Waters" (США) в следующих условиях: колонка Della-Pak C-18 (19 x 300 мм, 15 мкм); элюент 0,01 М трифторметанская кислота / 22% ацетонитрил, скорость потока 15 мл/мин, детекция при 230 нм.

После очистки пептид лиофилизовали.

Продукт гомогенен по данным тонкослойной хроматографии и электрофореза. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках фирмы "Merck" (Германия) в системах: трет-бутиловый спирт вода уксусная кислота 4:1:1 (R_f 0,13); н-бутиловый спирт уксусная кислота пиридин вода 15:3:10:12 (R_f 0,55); этилацетат пиридин уксусная кислота вода 25:20:6:11 (R_f 0,10).

Электрофорез проводили на бумаге "Filtrak" FN-12 в 2% уксусной кислоте при напряжении 150 В в течение 30 мин. Электрофоретическая подвижность продукта относительно глицина E_{Gly} 1,7.

Индивидуальность продукта подтверждена высокоэффективной

обращеннофазовой жидкостной хроматографией, его чистота составляет более 95% при выходе 0,115 г с 1 г пептидил-полимера, что соответствует 36% от теоретически рассчитанного.

Структура пептида подтверждена аминокислотным анализом на аминокислотном анализаторе T 339 M ("Microtechnic", Чехословакия). Данные анализа: Gly 1,02 (1); Leu 1,00 (1); Ser 0,95 (1); Pro 3,07 (3); Tyr 1,05 (1); Phe 1,02 (1); Lys 0,93 (1); Arg 0,93 (1).

По данным масс-спектрометрии пептид имеет массу 1160,6 (расчетное значение 1160,3). (Спектр снимали на времязадерживающем масс-спектрометре с источником "Электросpray" в Институте энергетических проблем химической физики).

Исследование противоопухолевой активности H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Исследование противоопухолевой активности проводилось в Институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей при Онкологическом научном центре ПАМН на крысах Ас и мышах С₃Н с опухолями предстательной и молочной желез соответственно. В опытных группах было 6-7 животных, в контрольных в два раза больше. Опухоли третьей генерации (предстательной железы от индуцированного метилхолантреном и тестостероном, молочной от спонтанного рака) перевивались животным под кожу правого бока. Препарат вводился подкожно в дистиллированной воде, крысам в течение 28, мышам 21 дня, в дозах 0,1; 1; 10 и 100 мкг/кг веса животного. Введение начинали через 48 ч, после перевивки. Через неделю, 2, 3 и 4 недели после начала лечения опухоли измеряли по трем взаимно перпендикулярным диаметрам, вычисляли объем, находили среднюю величину, процент торможения роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\frac{V_k - V_o}{V_o} \times 100\%$$

объем опухолей в контрольной и опытной группах соответственно.

На модели рака предстательной железы был испытан коммерческий препарат "бусеридин" в дозе 10 мкг/кг.

Результаты представлены в таблице 3.

Протокол изучения цитотоксической активности H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ на культуре клеток карциномы яичников линии CaOv

Препарат H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ проходил испытания в группе первичного отбора противоопухолевых препаратов НИИ экспериментальной диагностики в терапии опухолей ОНЦ РАМН. Вещество представляло собой лиофилизат, растворимый в воде.

В качестве объекта исследования была использована культура опухолевых клеток карциномы яичников человека (линия CaOv). Культуру клеток выращивали на среде 199, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, при 37°C.

Цитотоксический эффект исследуемых

соединений определяли радиометрическим методом по включению ^3H -тимидина в клетки линии CaOV по стандартной методике. Вещество считалось цитотоксическим, если величина его CE_{50} (дозы, препятствующей включению в клетки 50% меченого тимидина по отношению к контролю) не превышала $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Результат, представленный в таблице 2, свидетельствует, что цитотоксическая активность исследуемого препарата ниже существующего пограничного критерия.

Формула изобретения:

Декапептид формулы H Pro D Phe Pro Ser Tyr D Lys Leu - Arg Pro Gly NH₂, обладающий противоопухолевой активностью

RU 2 0 8 4 4 5 8 C1

R U 2 0 8 4 4 5 8 C1

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Препараты люлиберина и его аналогов, допущенные к терапевтическому применению, или находящиеся на клинических испытаниях

| Соединение Структура | Наименование | Компания - производитель |
|--|---|---|
| LHRH | Gonadorelin | Ayerst |
| LHRH | Cystorelin | Hoechst |
| LHRH | Cryptorelin | Hoechst |
| Агонисты люлиберина [D-Leu ⁶ ,Pro ⁹ NHEt]LHRH [D-Trp ⁶]LHRH [D-Trp ⁶ ,Pro ⁹ NHEt]LHRH [D-Trp ⁶ ,N-MeLeu ⁷ ,Pro ⁹ NHEt]LHRH [D-Ser(Bu) ⁶ ,Pro ⁹ NHEt]LHRH [D-Ser(Bu) ⁶ ,AzaGly ¹⁰]LHRH [D-His(Bzl) ⁶ ,Pro ⁹ NHEt]LHRH 9D-2Na ⁶]LHRH | Leuprorelin Tryptorelin Lutrelin Buserelin (Zolaadex) Histrelin Nafarelin acetate | Tapp/Abbott De Biopharm Salk Institute Wyeth Hoechst Icl Ltd. Ortho Syntex |
| Анtagонисты люлиберина [N-Ac-D-pCIPhe ¹ ,D-pCIPhe ² , D-Trp ³ ,D-Arg ⁶ ,D-Ala ¹⁰]LHRH [N-Ac-D-2Na ¹ ,D-pCIPhe ² ,D-Trp ³ , D-hArg(Et ₂) ⁶ ,D-Ala ¹⁰]LHRH | - | Organon Syntex |

Таблица 2

Изучение цитотоксической активности
H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

| Концентрация пептида, М | Торможение включения ³ H-тимидина, % | CE ₅₀ , М |
|-------------------------|---|----------------------|
| | | > 10 ⁻⁴ |
| 10 ⁻⁴ | 15 ± 4 | |
| 10 ⁻⁵ | 0 | |
| 10 ⁻⁶ | 0 | |

Таблица 3

| Тест | Разовая доза мкг/кг | % торможения (+ стимуляции) роста опухоли по отношению к контролю | | | |
|---|-------------------------------|---|-----|-----|------|
| | | Дни после начала лечения | | | |
| | | 8 | 15 | 22 | 29 |
| Перевиваемый рак молочной железы мышей C ₃ H | 100 | 45 | 61 | 43 | - |
| | 10 | 16 | 29 | 51 | - |
| | 1 | 35 | 44 | 44 | - |
| | 0,1 | 32 | 35 | 14 | - |
| Перевиваемый рак предстательной железы крыс Aci | 100 | +24 | 69 | 67 | 84 |
| | 10 | 0 | 46 | +50 | +92 |
| | 1 | +54 | 13 | 20 | +11 |
| | 0,1 | 17 | +11 | +20 | +103 |
| | "Бусерилин" в дозе 100 мкг/кг | 4 | 21 | 48 | 63 |

RU 2084458 C1

RU 2084458 C1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.